Verhalten von radioaktivem Chrom nach Erythrozytenmarkierung und nach intravenöser Injektion. Messungen der Gesamtkörperretention und Messungen im Blut bei der Ratte

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Herbert Flockermann

Saarbrücken

1970

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes
Direktor: Professor Dr.rer.nat. H. Muth

Verhalten von radioaktivem Chrom nach Erythrozytenmarkierung und nach intravenöser Injektion. Messungen der Gesamtkörperretention und Messungen im Blut bei der Ratte.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE DER
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1970

vorgelegt von
Herbert Flockermann
geb. am 28.12.1941 in Hamm

Dekan: Professor Dr.med. G. Dhom
Referent: Professor Dr.rer.nat.Dr.med. E. Oberhausen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promotionsdatum: 15.12.1970

Inhaltsangabe

I.	Einleitung	3
II.	Methode	5
III.	Eigene Ergebnisse	8
	Diagramm	10
IV.	Diskussion	12
V.	Zusammenfassung	15
VI.	Autorenverzeichnis	16
VII.	Danksagung	18
VIII.	Lebenslauf	19

I. Einleitung

Durch GRAY und STERLING (3) wurde 1950 das radioaktive Chrom in die Nuklearmedizin eingeführt. Aus dieser grundlegenden Arbeit über „die Markierung der Erythrozyten und der Plasmaproteine mit radioaktivem Chrom" ergeben sich zwanglos sämtliche zur Zeit bekannten diagnostischen Untersuchungen mit dem Chrom-51-isotop.

Auch heute gilt noch die Einteilung nach GRAY und STERLING, daß $Na_2{}^{51}CrO_4$ die Erythrozyten und andere Zellen etikettiert; $^{51}CrCl_3$ etikettiert vor allem Serumeiweiße. Die praktische Verwendung des Chromisotops resultiert aus einer günstigen Halbwertszeit (T= rund 27 Tage), Zerfallsrate pro die f_d = 0,01, mittlere Energie der Gammastrahlung 0,323 MeV, maximal zulässige Konzentration 100 Mikro-Curie/kg. Kritisches Organ ist der gesamte Körper. (Werte aus Standard Handbook (9) und International Comission etc.(6))

In der klinischen Routinediagnostik lassen sich Chromisotope vor allem bei folgenden Indikationen verwenden:

1. der Bestimmung der Erythrozytenmasse
2. der Erkennung fraglicher Hämolysen
3. der Erkennung gastrointestinaler Blutungen
4. der Bestimmung des Plasmavolumens.

Daß die oben angegebenen Indikationen eine allgemeine Verbreitung gefunden haben, zeigt zum Beispiel ihre Aufnahme in das -in Nordamerika- sehr populäre MERCK MANUAL (13).

Weiterhin klinisch bedeutend ist die Szintigraphie der Milz, bei der neben 99mTc auch 51Cr-markierte, thermisch geschädigte Erythrozyten verwendet werden.

Zuletzt sei als Beispiel noch die Messung des enteralen Serumproteinverlustes nach intravitaler Markierung der Serumproteine mit $^{51}CrCl_3$ genannt; siehe HEINRICH et al.(4). Diese Methode hat sich zur Routinediagnostik jedoch wohl noch nicht eingeführt.

Obgleich seit GRAY und STERLING (3) eine große Zahl von Nachuntersuchern über neue Erfahrungen und Erkenntnisse mit radioaktivem Chrom berichtet haben, bestand weiterhin folgende Frage, mit der die vorliegende Arbeit begonnen wurde:

Nach Markierung der Erythrozyten mit ^{51}Cr muß es aus chemischen und vor allem physiologischen Gründen (Blutmauserung) auch wieder zu einer Loslösung des Chroms kommen; was passiert nun mit dem am Erythrozyten freigesetzten Chrom ? Gibt es Unterschiede im Verhalten dieses freigesetzten Chroms im Vergleich zum intravenös injiziertem dreiwertigem Chrom ?

Es wurden daher folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. In vitro Markierung von Rattenerythrozyten und anschliessend a. Messung der Gesamtkörperretention
   b. Messung des Aktivitätsabfalls im Gesamtblut
2. Intravenöse Injektion von dreiwertigem Chrom und anschließend a. Messung der Gesamtkörperretention

II. Methode

1. Versuchstiere: Zur Erythrozytenmarkierung wurden 15 Albinoratten verwendet. Davon waren 7 Weibchen und 8 Männchen. Die Weibchen wogen zwischen 250 und 350 g; die Männchen zwischen 430 und 540g . Zur intravenösen Injektion des dreiwertigen 51Chroms wurden 10 Albinoratten verwendet. Davon waren 5 Weibchen und 5 Männchen. Die Weibchen wogen zwischen 240 und 330 g; die Männchen zwischen 400 und 500g.

2. Technik der Erythrozytenmarkierung: Es wurden jeweils 1,6 ml Blut aus der freigelegten Vena femoralis der Versuchstiere entnommen und mit 0,4ml ACD (Acid-Citrat-Dextrose) vermischt. Die Erythrozyten wurden dann durch 3-4 Minuten langes vorsichtiges Zentrifugieren vom Plasma getrennt.
Es folgte die Markierung mit jeweils ca. 10 Mikro-Curie Natrium-51Chromat in physiologischer NaCl-Lösung bei einer Temperatur von 25°C. Die Markierungsdauer betrug 20 Minuten. Zu Beginn jeder Markierung wurden noch jeweils 0,2ml ACD hinzugefügt. (modifiziert nach MOLLISON, P.L. (8); in Anwesenheit von ACD kürzere Markierungsdauer und höherer Markierungseffekt)
Nach erfolgter Markierung wurde zweimal in kalter physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Dann wurden die Erythrozyten in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt und es erfolgte Reinjektion der Erythrozytenaufschwemmung in dieselbe oder kontralaterale Vena femoralis.
Die Tiere standen während der ganzen Vorgänge unter Narkose

mit Nembutal^{R} (Fa.Abbot). Die Dosis betrug 40mg Nembutal/kg Körpergewicht. Die Narkoseinjektion erfolgte intraperitoneal.

3. Weitere Versuchsvorgänge:

a. 15-20 Minuten nach der Injektion der Erythrozytenaufschwemmung wurde die Gesamtaktivität der Versuchstiere im Ganzkörperzähler gemessen.

b. 20-40 Minuten nach der Injektion wurde aus den Schwanzvenen der Versuchstiere Blut in einer Menge von jeweils zwischen 0,05 und 0,1g entnommen und die Aktivität der einzelnen Proben im NaJ-Bohrlochkristall gemessen.

c. Der zweiten Tiergruppe (10 Versuchstiere) wurde pro Tier jeweils ca. 10 Mikrocurie 51Chromchlorid in eine Schwanzvene injiziert. Die Tiere befanden sich während der Injektion im leichten Ätherrausch. Die jeweils erste Messung im Ganzkörperzähler erfolgte 60 Minuten post injectionem.

Sämtlichen Messungen unter Abschnitt 3 folgten weitere Messungen im Abstand von 2-4 Tagen über einen Gesamtzeitraum von jeweils 4 Wochen.

Auswertung der Versuchsergebnisse:

Die erhaltenen Nettowerte wurden auf die jeweils mitgemessenen Standardwerte bezogen. Der jeweils erste gemessene Wert wurde gleich 1 (oder 100) normiert.

Die Werte, die nach Erythrozytenmarkierung durch Messen der Blutproben im Bohrlochkristall und durch Messen der Versuchs-

tiere im Gesamtkörperzähler erhalten wurden (siehe II. 3a und 3b), wurden auf Lochstreifen geschrieben. Die Ausgleichsgeraden wurden dann mit Hilfe des Rechners vom Typ ZUSE Z 25 der Ingenieurschule Saarbrücken ermittelt. Das Programm zur Berechnung wurde freundlicherweise von Herrn Diplomphysiker K.H. Matt, damals tätig am Institut für Biophysik in Homburg im Saarland, zur Verfügung gestellt.

Die Werte, die nach intravenöser Markierung und anschliessender Ganzkörperzählung der Versuchstiere gewonnen wurden (siehe II.4), wurden zunächst graphisch dargestellt. Durch diese vorläufige graphische Darstellung wurde die Gleichung $y = 0 + 26 \cdot e^{-28t} + 50 \cdot e^{-0,0115t}$ gefunden, die zur genaueren Berechnung der Exponentialfunktionen als Näherungswert zugrunde gelegt wurde. Die Berechnung erfolgte ebenfalls mit oben angegebenem Rechner (ZUSE Z 25).

III. Eigene Ergebnisse

1. Nach in vivo Injektion von $^{51}Cr^{+++}$ ergiebt sich ein Kurvenverlauf, dem, dargestellt auf semilogarithmischem Papier, mindestens zwei Exponentialfunktionen zugrunde gelegt werden müssen. Die Berechnungen ergaben, berechnet nach den Mittelwerten aller Versuchsergebnisse:

$$y_1 = A \cdot e^{\lambda_1 t} + B \cdot e^{\lambda_2 t}$$

$$y_1 = 43{,}81 \cdot e^{-0{,}99177t} + 5{,}619 \cdot e^{-0{,}016402t}$$ (Kurve 1 im Diagramm)

Obere Grenzwerte: A=53,2 B=63,8 λ_1=-0,5637 λ_2=-0,01234
Untere Grenzwerte: A=36,2 B=46,8 λ_1=-1,2420 λ_2=-0,01914

2. Die Werte nach Erythrozytenmarkierung mit 51Chromat ergeben auf semilogarithmischem Papier einen geradlinigen Abfall. Es besteht zwischen den beiden Geraden, die einerseits die Gesamtkörperretention und andererseits den Aktivitätsabfall im Blut darstellen, eine deutliche Divergenz; und zwar zeigen die Werte für die Gesamtkörperretention einen deutlich geringeren Abfall der Aktivität als die Werte für die Aktivitätsabnahme im Gesamtblut.

Die Berechnungen:

a. Für den Verlauf der Aktivität im Gesamtblut ergaben die Mittelwerte aller Einzelmessungen nach der Gleichung

$$y_2 = C \cdot e^{\lambda_3}$$

$$y_2 = 9{,}473 \cdot e^{-0{,}04459t}$$ (Kurve 2 im Diagramm)

Obere Grenzwerte: C = 10,45 λ_3= -0,02690
Untere Grenzwerte: C = 7,40 λ_3= -0,61800

b. Und entsprechend für die Gesamtkörperretention:

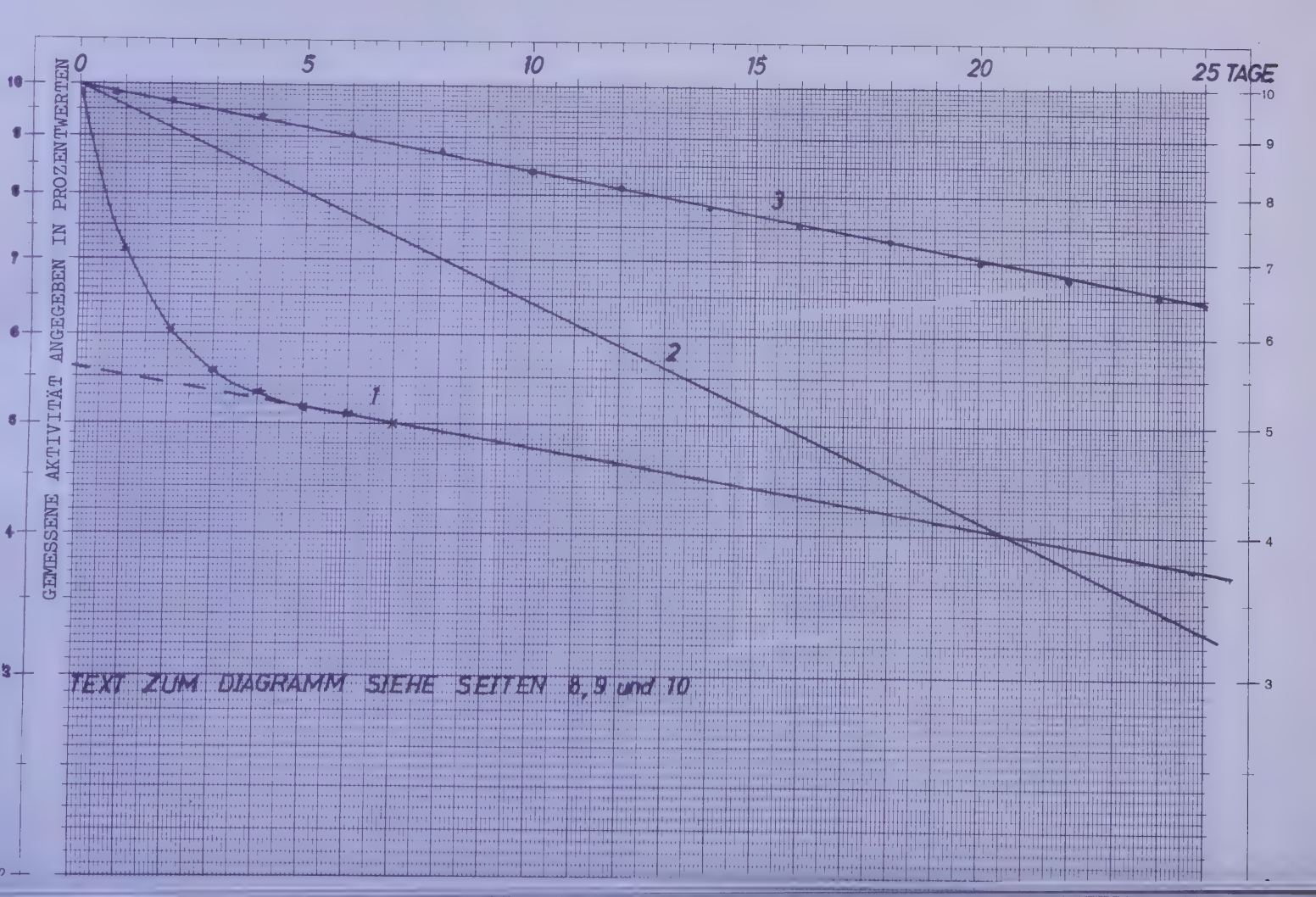
$y_3 = D.e$

$y_3 = 9{,}57\ e^{-0{,}01738t}$ (Kurve 3 im Diagramm)

Obere Grenzwerte: D = 10,1 λ_4= -0,01341
Untere Grenzwerte: D = 8,7 λ_4= -0,22680

Da nur das relative Verhalten der Gleichungen von Bedeutung ist, wurden die y-Werte für t = 0 rechnerisch und graphisch gleich 100 Prozent festgesetzt.

Die Aktivität im Plasma betrug bei Stichproben immer weniger als 0,6 % von der Gesamtaktivität der Blutproben.
Die an Hand der Zeichnungen ermittelte Halbwertszeit beträgt beim Aktivitätsverlauf im Gesamtblut 15,5 Tage; obere und untere Grenzen 18 und 13 Tage.
Gleichermaßen ergaben sich für die Halbwertszeiten nach Erythrozytenmarkierung und Messen der Gesamtkörperretention als oberster Wert 51 Tage und als unterster Wert 26 Tage. Durchschnittlich lagen die meisten Werte zwischen 35 und 45 Tagen.


0
5
10
15
20
25 TAGE
GEMESSENE AKTIVITÄT ANGEGEBEN IN PROZENTWERTEN
10
9
8
7
6
5
4
3
1
2
3
TEXT ZUM DIAGRAMM SIEHE SEITEN 8, 9 und 10

Vergleich der gefundenen Kurven:

Die Berechnung und der Vergleich der gefundenen Kurven ergibt nun folgendes: Wenn man annimmt, daß 51Cr, das beim Zerfall von Erythrozyten frei wird, im Organismus wie injiziertes dreiwertiges 51Cr behandelt wird, ergiebt sich für die Aktivität im Organismus (ohne Erythrozyten) folgende Funktion:

$$G = 4{,}381 \left\{ \frac{\lambda_3}{\lambda_3 - \lambda_1} e^{-\lambda_1 t} + \frac{\lambda_3}{\lambda_1 - \lambda_3} e^{-\lambda_3 t} \right\} + 5{,}619 \left\{ \frac{\lambda_3}{\lambda_3 - \lambda_2} e^{-\lambda_2 t} + \frac{\lambda_4}{\lambda_2 - \lambda_3} e^{-\lambda_3 t} \right\}$$

Addiert man hierzu die Aktivität des Blutes, so erhält man die Gesamtaktivität der Tiere, wie sei im Gesamtkörperzähler gemessen wurde. Die numerische Berechnung von E + G ergibt die in der Graphischen Darstellung eingezeichneten Punkte.
(Zur Erinnerung: $E = C \cdot e^{-\lambda_3 t}$; $C=10$; $\lambda_3=0{,}04459$)
Danach stimmen die Werte mit der gemessenen Gesamtkörper - aktivität überein; Dies ist ein starker Hinweis dafür, daß am Erythrozyten freigesetztes 51Cr sich genauso verhält wie injiziertes dreiwertiges 51Chrom.

IV. Diskussion

In der Literatur werden keine direkten Vergleichsuntersu - chungen gefunden. - Als Nebenergebnis und zur Kontrolle wurden die Halbwertszeiten und damit die Überlebenszeiten der Rattenerythrozyten bestimmt.- Die letzten und genauesten Untersuchungen gehen auf OWEN und ORVIS (10) zurück. Sie fanden eine durchschnittliche Überlebensdauer der Erythrozyten von 54 Tagen. Die "elution rate" wird zwischen 1-2% pro Tag angegeben; Grenzen der "elution rate" 0,8-2% pro Tag. Der Mittelwert war 0,98% pro Tag mit einer Standardabweichung von 0,42. WOLF und KRÖNERT (14) fanden beim Menschen eine "elution rate" von 0,8-1,0% bei Normalpersonen. - Damit liegen die eigenen Werte um ein geringes unter den Werten von OWEN und ORVIS (10), nach denen sich eine Halbwertszeit von 16,9 Tagen ergibt. Zum Vergleich: Bei Mäusen fand THORLING (12) nach Erythrozytenmarkierung und Messung im Gesamtkörperzähler eine Halbwertszeit von 18-20 Tagen.

Da in der vorliegenden Arbeit die y-Werte für t = 0 gleich 1 oder 100 Prozent normiert wurden, wurde der sogenannte "early loss", das heißt nach KLEINE und HEIMPEL (7), die bei Untersuchungen am Menschen fanden, daß es sich um eine anfangs schnellere Loslösung der Markierung (bzw. eines Teils der Markierung) vom Erythrozyten handle, unberücksichtigt gelassen. Da in der vorliegenden Arbeit über jeweils 4 Wochen gemessen wurde, ist der sogenannte "early loss", der direkt nach der Injektion am größten ist, hier ohne besondre Bedeutung.

Nach einem von FRANKE, HENNIG, WOLLER (1) aufgestelltem Modell eliminiert ein Depot die geschädigten Erythrozyten aus dem Blut in Konkurrenz zu der langsamer aufnehmenden Milz. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch eher annehmen, daß ein weiterer bedeutender Faktor außer dem lienalen nicht vorhanden ist, da die Kurven 2 und 3 aus nur jeweils einer Exponentialfunktion bestehen. Nach FRANKE et al. (1) müßte das morphologische Substrat eines angenommenen Depots in erster Linie das extralienale RHS sein.
Genauere Untersuchungen über die Verteilung in der Ratte nach intravenöser Gabe von ^{51}Cr wurden von L.L. HOPKINS,JR. (5) durchgeführt. Initial erhielten die vaskulären Organe, wie zum Beispiel Herz, Nieren und Lungen den höchsten ^{51}Cr - Spiegel, während die weniger vaskulären Organe, wie etwa Gehirn und Testes den niedrigsten Spiegel hatten. Der Betrag des retinierten Chroms war zwischen den verschiedenen Orga - nen sehr variabel. Herz, Pankreas, Lunge und Gehirn reti - nierten kleinere Mengen, während Niere, Milz, Testes, Epidi- dymis und Knochen entweder ihren initialen Spiegel beibe - hielten oder erhöhten.- Die eigenen Untersuchungsergebnisse sprechen nun dafür, daß das <u>am Erythrozyten</u> freigesetzte Chrom ebenso wie das intravenös injizierte Chrom vor allem von den zuletzt genannten Organen retiniert wird.
FRANK und GRAY (2) benutzten die intravitale Bindung des $^{51}Cr^{3+}$, um das Blutplasmavolumen zu bestimmen. Nach FRANK und GRAY (2) werden über 98% des intravenös injizierten dreiwertigen ^{51}Cr sogleich nach der Injektion an die Plasma-

proteine gebunden. (Ein geringer Teil der 51Cr-Menge wird sofort mit dem Harn ausgeschieden; siehe auch HEINRICH et al. (4).) Es ließe sich daher vermuten, daß das an den Erythrozyten freigesetzte 51Cr über die einzelnen Serumproteinfraktionen den gleichen Weg nimmt wie das direkt intravenös injizierte $^{51}Cr^{3+}$. Dafür kämen zwei Wege in Frage: 1. Das Chrom löst sich vom intakten Erythrozyten und wird an die Serumproteine gebunden. (Nach OWEN und ORVIS (10) verschwindet das 51 Chrom nach Erythrozytenmarkierung schneller aus der Blutbahn als das 59Fe mit dem die Erythrozyten markiert wurden.) Das heißt, es kommt ständig zu einer Loslösung des 51Chroms. 2. Das 51Chrom verläßt das Hämoglobin der Erythrozyten bei der Blutmauserung vorwiegend in der Milz. Auch hier bestünde die Möglichkeit einer Bindung an die Serumproteine. Welcher Weg der bedeutendere ist, ist an Hand der bisher vorliegenden Literatur über 51Cr nicht zu entscheiden, auch wenn hier die Untersuchungen von OWEN, ORVIS und KIELY (11) noch weiteren Einblick brachten. Sie ergaben, daß sich bei splenektomierten Ratten nach zwei Wochen bedeutend mehr 51Cr akkumuliert hatte als bei normalen Vergleichstieren. Dieselben Autoren beschrieben auch, daß nach intravenöser Gabe von $^{51}Cr^{3+}$ mehr als 1/5 der Dosis in der Rattenmilz gefunden wurde. Es wurde ferner eine deutliche Korrelation zwischen dem Abfall der Chromaktivität im Blut und der Zunahme der Aktivität in der Milz beschrieben. OWEN et al. (11) bestätigen also das Ergebnis von Hopkins (5), daß dreiwertiges 51Cr auch unabhängig von den Erythrozyten in der Milz akkumuliert. Das Problem, an welchem Ort -Blutbahn oder Milz- es zur Loslösung des Chroms vom Erythrozyten

kommt, ist aber wohl zur Zeit noch ungelöst.

V. Zusammenfassung

Es wurden Ratten erythrozyten mit radioaktivem Chrom markiert. Ferner wurde Ratten radioaktives dreiwertiges Chrom intravenös injiziert. Jeweils über vier Wochen wurde die Gesamtkörperretention der Versuchstiere gemessen. Ferner wurde der Aktivitätsabfall im Blut der Tiere gemessen, bei denen Erythrozyten markiert worden waren. Mit Hilfe eines elektronischen Rechners vom Typ ZUSE Z 25 wurden die Ausgleichsgeraden und die entsprechenden Exponentialfunktionen errechnet. Durch den Vergleich der gefundenen Kurven, im besonderen durch Addition der Aktivität im Organismus (ohne Erythrozyten) mit der Aktivität des Blutes ergab sich in der numerischen Berechnung ein Kurvenverlauf, der sich mit der bei der Messung der Gesamtkörperaktivität gemessenen Kurve deckte. Dies ist ein starker Hinweis dafür, daß am Erythrozyten freigesetztes Chrom sich nach der Loslösung genau so verhält wie intravenös injiziertes dreiwertiges Chrom.

VI. Autorenverzeichnis

1. FRANKE, W.G. et al. Functional test of reticulohistiocytic system with radiochromium - labeled damaged red cells
Nuklearmedizin 6 : 295 -303 (1967)

2. FRANK, H. and GRAY, S.J. The determination of plasma volume in man with radioactive chromium chloride
J. Clin. Invest. 32 : 991 (1953)

3. GRAY and STERLING The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium
J. Clin. Invest. 29 : 1604 (1950)

4. HEINRICH, H.C. et al. Stoffwechselverhalten der 51Cr - Markierung im menschlichen Körper nach intravenöser Injektion von $51Cr^{+++}$ - Ein Beitrag zur Diagnostik des enteralen Serumproteinverlustes bei exsudativer Gastro - enteropathie-
Medizinische Welt 16 : 835 -39 (1966)

5. HOPKINS, L.L. Distribution in the rat of physiological amounts of injected Cr51(III) with time
Am. J. Phsiol. 209(4) : 731 -35 (1965)

6. INTERNATIONAL COMISSION OF RADIOLOGICAL PROTECTION (1965)

7. KLEINE and HEIMPEL The early loss of radioactivity in Cr51 survival curves: destruction of cells or loss of the label ?
Blood 26 : 819 -22 (1965)

8. MOLLISON, P.L. Further observations on the normal survival curves of Cr51-labeled red cells
Clin. Sc. 21 : 21 (1961)

9. NATIONAL BUREAU OF STANDARDS HANDBOOK 52 Maximum permissible amounts of radioisotopes in the human and maximum permissible concentrations in air and water
Seiten 15 - 16 (Washington 1953)

10. OWEN and ORVIS Elution of chromium from rat erythrocytes
Am. J. Physiol. 210(3) : 573-75 (1965)

11. OWEN, ORVIS and KIELY Sequestration of erythrocytes by rat spleen
Am. J. Physiol. 211 : 273 (1966)

12. THORLING, E.B. Whole body counting in erythrocyte survival studies
Blood 28 : 934 (1967)

13. The MERCK MANUAL 11th Edition 1785 (1966)

14. WOLF, F. et al. The elution of labeling isotopes as an uncertainly factor of Cr51 method

---

VII. Danksagung

Herrn Professor Dr.rer.nat. Dr.med. E. Oberhausen danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei meiner Arbeit.
Herrn Professor Dr.rer.nat. H.Muth danke ich für seine Bereitwilligkeit, daß ich die vorliegende Arbeit am Institut für Biophysik durchführen konnte.

VIII. Lebenslauf

Am 28. Dezember 1941 wurde ich als Sohn des Personalchefs Karl Flockermann und seiner Ehefrau Wilhelmine, geb.Knäpper in Hamm in Westfalen geboren. - Ich bin verheiratet mit der Ärztin Karin Elisabeth Flockermann. Wir haben ein Kind.

Mein Bildungsweg verläuft folgendermaßen: Nach dem Besuch der üblichen Schulen legte ich am 22. Februar 1963 an der Melanchthon-Schule in Steinatal im Bezirk Kassel die Reifeprüfung ab. Ab Sommersemester 1963 studierte ich an den Universitäten in Saarbrücken, Innsbruck, Kiel und Heidelberg Medizin. Ich famulierte in Berlin, Hamm und Hamilton-Ontario in Kanada. Am 22. November bestand ich vor dem Prüfungsausschuß in Homburg-Saar die Ärztliche Prüfung. Nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit in Homburg-Saar (Institut für Biophysik) und in Ottweiler-Saar und Ziegenhain (Kreiskrankenhäuser) bin ich seit dem 2. Januar 1970 approbierter Arzt. Am 16. April 1970 habe ich eine wissenschaftliche Assistentenstelle am Universitätskrankenhaus in Hamburg-Eppendorf angetreten.